

Cited Reference #3 - English Abstract

MENU

SEARCH

INDEX

DETAIL

JAPANESE

LEGAL  
STATUS

1 / 1

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-089264

(43)Date of publication of application : 09.04.1996

(51)Int.Cl. C12P 7/62

C08G 63/06

(21)Application number : 06-224977

(71)Applicant : CHIKYU KANKYO SANGYO GIJUTSU  
KENKYU KIKO  
RIKAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 20.09.1994

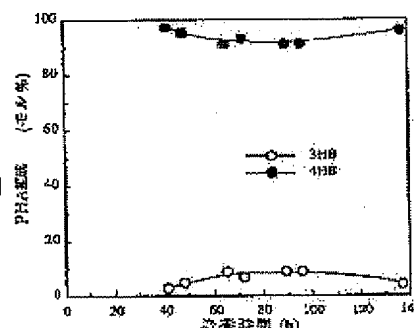
(72)Inventor : SAITO YUJI  
DOI YOSHIHARU

## (54) PRODUCTION OF POLYESTER COPOLYMER

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a process for the microbial production of a copolymerized polyester having high ratio of 4-hydroxybutyrate unit compared with conventional process.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to the genus Comomanas (e.g. Comomanas acidovorans IFO 13582) is cultured in a medium containing 1,4- butanediol or 4-hydroxybutyric acid ion and the subject copolymerized polyester is collected from the cultured product. In the figure, '3HB' is 3-hydroxybutyrate unit of formula  $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}$  and '4HB' is 4-hydroxybutyrate unit of formula  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ .





# cited Reference #3

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-89264

(43) 公開日 平成8年(1996)4月9日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 7/62

7432-4B

C 0 8 G 63/06

N L Q

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-224977

(22) 出願日 平成6年(1994)9月20日

(71) 出願人 591178012

財団法人地球環境産業技術研究機構

京都府相楽郡木津町木津川台9丁目2番地

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 斎藤 祐二

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成

建設株式会社内

(72) 発明者 土肥 義治

神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39

(74) 代理人 弁理士 森 哲也 (外2名)

(54) 【発明の名称】 ポリエステル共重合体の製造方法

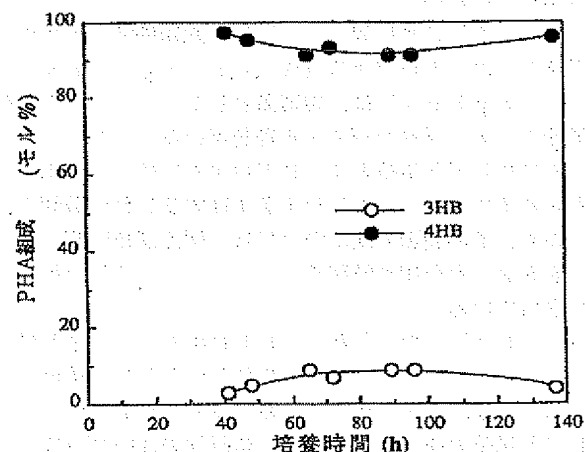
(57) 【要約】

【目的】 共重合ポリエステルを微生物を用いた製造方法において、4-ヒドロキシブチレート単位が存在比が従来より高いものが得られる方法を提供する。

【構成】 コマモナス属に属する菌（例えば、コマモナス-アシドボランズ I F O 1 3 5 8 2）を、1, 4-ブタンジオールまたは4-ヒドロキシ酪酸イオンを含む培地で培養し、当該培養物から前記共重合ポリエステルを採取する。なお、図2中の「3HB」は下記の(1)式に示す3-ヒドロキシブチレート単位、「4HB」は下記の(2)式に示す4-ヒドロキシブチレート単位である。

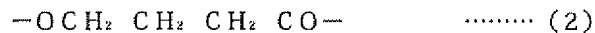
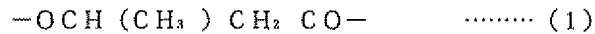
$\text{—OCH(CH}_3\text{)CH}_2\text{CO—}$  ..... (1)

$\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO—}$  ..... (2)



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の(1)式で表される3-ヒドロキシブチレート単位と下記の(2)式で表される4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルを生産能力を有するコマモナス属に属する菌を、1, 4-ブタンジオール、または4-ヒドロキシ酪酸イオンを含む培地で培養し、当該培養物から前記共重合ポリエステルの採取することを特徴とするポリエステル共重合体の製造方法。



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、微生物により分解可能で生体適合性にも優れた熱可塑性プラスチックである、3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルの、微生物を用いた製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】エネルギー貯蔵物質として多種類の微生物の細胞内に蓄積されるポリヒドロキシアルカノエイトは、微生物により分解可能なプラスチック材料として注目されている。このようなポリヒドロキシアルカノエイトのうち、特に、3-ヒドロキシブチレート単位のみからなるポリ-3-ヒドロキシブチレートは、微生物による分解性に優れるとともに、加水分解性、生体適合性、光学活性をも有する機能性材料として評価されている。しかしながら、このポリ-3-ヒドロキシブチレートは、結晶性が高いことから脆性であるため未だ実用化には至っていない。

【0003】これに対して、近年、水素細菌のアルカリゲネス・ユートロファス(*Alcaligenes eutrophus*)は、炭素源として4-ヒドロキシ酪酸や1, 4-ブタンジオール等を用いると、3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルの生産することが確認されており、その製造方法については、例えば特開昭64-48821号公報や特開平1-156320号公報に記載されている。

【0004】このような3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルは、当該共重合体における4-ヒドロキシブチレート単位の存在量に応じて、結晶性の高いプラスチックから弾性に富むゴムまで幅広い性質の高分子材料となり得ることが確認されている。したがって、用途に応じた性質となるように当該共重合体における4-ヒドロキシブチレート単位の存在量を制御することにより、多様な用途に対応することが期待される。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このよ

うな3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルについては、前述の特開昭64-48821号公報や特開平1-156320号公報に記載されているアルカリゲネス・ユートロファスを用いた製造方法によると、当該共重合体における4-ヒドロキシブチレート単位の存在比が60モル%以下のものしか得られないため、極めて柔軟で強靱な性質を必要とする用途(例えば、構造材料や釣り糸、手術用糸等)には適用できない。

【0006】また、前述の公報に記載されているように、このようなアルカリゲネス・ユートロファスを用いて前記共重合ポリエステルの製造するためには、当該菌体は窒素やリンの存在下では当該共重合体を生産し難いため、当該菌体の培養を前後段に分けて、前段で当該菌体の増殖を行った後に、後段で炭素源を含み且つリンおよび/または窒素制限下の培地において当該菌体の培養を行う必要がある。そのため、当該共重合体の製造工程が複雑となっている。

【0007】この発明は、このような従来技術の問題点を解決するためになされたものであり、3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルの微生物を用いた製造方法において、前記4-ヒドロキシブチレート単位の存在比が60モル%を超える共重合ポリエステルが得られ、さらには菌体の培養が一工程でなされる方法を提供することを目的とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、この発明に係るポリエステル共重合体の製造方法は、下記の(1)式で表される3-ヒドロキシブチレート単位と下記の(2)式で表される4-ヒドロキシブチレート単位とからなる共重合ポリエステルの生産能力を有するコマモナス属に属する菌を、1, 4-ブタンジオールまたは4-ヒドロキシ酪酸イオンを含む培地で培養し、当該培養物から前記共重合ポリエステルの採取することを特徴とするものである。

## 【0009】



前記コマモナス属に属する菌としては、例えばコマモナス・アシドボランズ(*Comamonas acidovorans*)菌株があり、これらの菌株として入手が容易なものに、コマモナス・アシドボランズIFO13582がある。

【0010】本発明の方法で使用する培地は、炭素源として少なくとも1, 4-ブタンジオールまたは4-ヒドロキシ酪酸イオンを含むものであるが、これ以外の炭素源として、通常使用されているグルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、乳酸などを含んでいてもよい。また、本発明の

方法で使用する培地には、通常使用されるような栄養成分、例えば酵母エキスやミネラル類、ビタミン類等を含むことができる。

#### 【0011】

【作用】この発明に係るポリエステル共重合体の製造方法によれば、コマモナス属に属する菌を用いて、1, 4-ブタンジオールまたは4-ヒドロキシ酪酸イオンを含む培地で培養することにより、当該培養物から、4-ヒドロキシブチレート単位を60モル%より多く含む共重合ポリエステルが得られる。また、この菌株による当該共重合体の合成は、リンや窒素の存在下においても容易になされるため、アルカリゲネス・ユートロファスを用いた場合のように当該菌体の培養を前後段に分ける必要がなく、一工程で菌体の増殖と共重合体の合成とがなされる。

#### <培地組成>

脱イオン水

炭素源 (表1参照)

0.5M リン酸水素カリウム水溶液

0.5M リン酸水素二カリウム水溶液

2.0wt/V% 硫酸マグネシウム水溶液

(全量100ミリリットルにMgSO<sub>4</sub> 20gの割合)

ミネラル溶液 (下記の組成のもの)

#### <ミネラル溶液の組成>

0.1N HCl 1リットル

CoCl<sub>2</sub> 119.0mg

NiCl<sub>2</sub> 118.0mg

FeCl<sub>2</sub> 9.7mg

CrCl<sub>2</sub> 62.2mg

CaCl<sub>2</sub> 7.8mg

CuSO<sub>4</sub> 156.4mg

培養終了後、菌体を所定の方法で回収し、凍結乾燥して乾燥菌体を得た。得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで細胞内に蓄積された物質を抽出し、濃縮した抽出液にヘキサンを添加して共重合ポリエステルを沈殿させ、再沈殿した後に濾過して得られた共重合ポリエステルを乾燥させた。また、前記乾燥菌体の重量とこの乾燥した共

#### \*【0012】

##### 【実施例】

【実施例1】ポリペプトン1g、酵母エキス0.5g、および塩化ナトリウム0.5gを含む100ミリリットルの培地に、凍結保存したコマモナス・アシドボランズ (IFO13582) を1ミリリットル接種し、30℃で24時間好氣的に培養することにより、当該菌体を増殖した。このようにして増殖された菌体を含む培養液を遠心分離機にかけて、増殖された菌体を回収した。この回収された菌体を、以下に示す組成の、唯一の炭素源として1, 4-ブタンジオールまたは4-ヒドロキシ酪酸を所定濃度含む窒素制限の培地で、48時間好氣的に培養した。

#### 【0013】

100ミリリットル

1.0gまたは1.5g

3.9ミリリットル

5.36ミリリットル

0.1ミリリットル

0.1ミリリットル

※ 重合ポリエステルの重量とを測定し、これらの測定値から菌体中のポリエステル含有量を算出した。また、得られた共重合ポリエステルをガスクロマトグラフィーと<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにかけ、3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位の存在割合を調べた。

【0014】これらの結果を、培地に使用した炭素源およびその濃度とともに下記の表1に示す。なお、表1の「PHA」は共重合ポリエステルを示し、「3HB」は3-ヒドロキシブチレート単位を、「4HB」は4-ヒドロキシブチレート単位をそれぞれ示す。

#### 【0015】

##### 【表1】

炭素源	(g/l)	菌体重量 (g/l)	PHA含有率 (wt%)	PHA組成 (モル%)	
				3HB	4HB
4-ヒドロキシ酪酸	1.0	2.2	2.1	1	9.9
4-ヒドロキシ酪酸	1.5	2.1	1.8	2	9.8
1,4-ブタンジオール	1.0	2.1	1.7	3	9.7
1,4-ブタンジオール	1.5	2.3	2.3	1	9.9

【0016】表1に示すように、コマモナス・アシドボランズ (IFO13582) 菌体は、1, 4-ブタンジオールまたは4-ヒドロキシ酪酸を含む培地で培養する

ことにより、4-ヒドロキシブチレート単位を9.7モル%以上含む共重合ポリエステルを、乾燥菌体の2.0wt%に近いまたはそれ以上の割合で生産することが分か

る。

〔実施例2〕以下に示す組成の培地1リットルに、凍結保存したコマモナス―アシドボランズ（IFO13582）を50ミリリットル接種し、30℃で140時間好\*

<培地組成>

脱イオン水	1リットル
グルコース	40g
酵母エキス	16g
4-ヒドロキシ酪酸ナトリウム	10g
0.5M リン酸水素カリウム水溶液	39.0ミリリットル
0.5M リン酸水素二カリウム水溶液	53.6ミリリットル
20wt/V% 硫酸マグネシウム水溶液 (全量100ミリリットルにMgSO <sub>4</sub> 20gの割合)	1.0ミリリットル
ミネラル溶液(実施例1と同じ組成のもの)	1ミリリットル

得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで細胞内に蓄積された物質を抽出し、濃縮した抽出液にヘキサンを添加して共重合ポリエステルを沈殿させ、再沈殿した後に濾過して得られた共重合ポリエステルを乾燥させた。また、前記乾燥菌体の重量とこの乾燥した共重合ポリエステルの重量とを測定し、これらの測定値から菌体中のポリエステル含有率を算出した。また、得られた共重合ポリエステルをガスクロマトグラフィーと<sup>13</sup>C-NMRスペクトルにかけ、3-ヒドロキシブチレート単位(3HB)と4-ヒドロキシブチレート単位(4HB)の存在割合および連鎖状態を調べた。

【0018】これらの結果を図1～3に示す。図1は、培養時間と、ポリエステル含有率および培地1リットル当たりの乾燥菌体重量との関係を示すグラフであり、図2は、培養時間と得られた共重合ポリエステル中の前記各単位の存在率との関係を示すグラフであり、図3は、98時間の培養で得られた共重合ポリエステルの500MHzでの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルの解析結果である。\*

<培地組成>

脱イオン水	1リットル
グルコース(表2参照)	40g, 20g
酵母エキス(表2参照)	16g, 8g, 4g, 2g
4-ヒドロキシ酪酸ナトリウム	10g
0.5M リン酸水素カリウム水溶液	39.0ミリリットル
0.5M リン酸水素二カリウム水溶液	53.6ミリリットル
20wt/V% 硫酸マグネシウム水溶液 (全量100ミリリットルにMgSO <sub>4</sub> 20gの割合)	1.0ミリリットル
ミネラル溶液(実施例1と同じ組成のもの)	1ミリリットル

得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで細胞内に蓄積された物質を抽出し、濃縮した抽出液にヘキサンを添加して共重合ポリエステルを沈殿させ、再沈殿した後に濾過して得られた共重合ポリエステルを乾燥させた。また、前記乾燥菌体の重量とこの乾燥した共重合ポリエステルの重量とを測定し、これらの測定値から菌体中のポリエステル含有率を算出した。また、得られた共重合ポリエステルをガスクロマトグラフィーにかけて、3-ヒド

\* 気的に培養した。培養中に所定の培養時間毎に培養液を採取し、各培養液を遠心分離機にかけて菌体を回収し、回収された菌体を凍結乾燥した。

【0017】

※なお、図3の構造式に付した数字は、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルの各ピークの数字に対応するものである。

【0019】これらの結果から、コマモナス―アシドボランズ(IFO13582)菌体は、グルコース、酵母エキス、および4-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを含む培地で培養することにより、4-ヒドロキシブチレート単位を90モル%以上含む共重合ポリエステルを生産することが分かる。また、得られた共重合体は、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル解析の結果、3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位とがランダムに共重合した理想的なランダム共重合体であることが分かる。

〔実施例3～14〕以下に示す各組成の培地1リットルに、凍結保存したコマモナス―アシドボランズ(IFO13582)を50ミリリットル接種し、30℃で好気的に培養した。培養開始後48時間または76時間に培養液を採取し、各培養液を遠心分離機にかけて菌体を回収し、回収された菌体を凍結乾燥した。

【0020】

ロキシブチレート単位(3HB)と4-ヒドロキシブチレート単位(4HB)の存在割合を調べた。

【0021】これらの結果を、使用した各培地の組成とともに下記の表2に示す。なお、表1の「PHA」は共重合ポリエステルを示し、「3HB」は3-ヒドロキシブチレート単位を、「4HB」は4-ヒドロキシブチレート単位をそれぞれ示す。

【0022】

【表2】

	培地組成 (g/l)			培養時間 (h)	菌体重量 (g/l)	PHA含有率 (wt%)	PHA組成 (モル%)	
	グルコース	酵母エキス	4-ヒドロキシ酪酸Na				3HB	4HB
実施例3	40	16	10	48	4.19	16.7	18.6	81.4
実施例4	40	16	10	76	4.48	10.9	0	100.0
実施例5	40	8	10	48	2.83	15.6	20.2	79.8
実施例6	40	8	10	76	2.80	17.2	21.5	78.5
実施例7	40	4	10	48	1.43	15.0	27.8	72.2
実施例8	40	4	10	76	1.48	17.8	29.2	70.8
実施例9	20	8	10	48	2.85	15.6	22.2	77.8
実施例10	20	8	10	76	2.89	15.4	18.5	81.5
実施例11	20	4	10	48	1.58	18.5	26.0	74.0
実施例12	20	4	10	76	1.49	17.8	24.1	75.9
実施例13	20	2	10	48	0.82	14.1	21.0	79.0
実施例14	20	2	10	76	0.95	20.0	21.7	78.3

【0023】表2に示すように、コマモナス・アシドボランズ (IFO13582) 菌体は、4-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを含む培地で培養することにより、培養時間や酵母エキスの濃度に係わらず、4-ヒドロキシブチレート単位を70モル%以上含む共重合ポリエステルを、乾燥菌体の10wt%以上の割合で生産することが分かる。また、培地中の酵母エキス量を多くすることにより、4-ヒドロキシブチレート単位が100%のポリ-4-ヒドロキシブチレートを得ることも可能である。

## 【0024】

【発明の効果】以上説明したように、この発明のポリエステル共重合体の製造方法によれば、コマモナス属の菌体を、1、4-ブタンジオール、または4-ヒドロキシ酪酸イオンを含む培地で培養することにより、4-ヒドロキシブチレート単位を例えば70モル%以上の高い比率で含有する共重合ポリエステルを得ることができる。また、当該菌体の培養が一工程でなされるため、共重合\*

\* ポリエステルを容易に効率良く得ることができる。

【0025】このような4-ヒドロキシブチレート単位を高い比率で含有する共重合ポリエステルは、生体適合性が高いとともに、極めて柔軟で且つ強靱な性質を備えているため、構造材料や釣り糸、手術糸などの医療用材料として有用なものとなる。

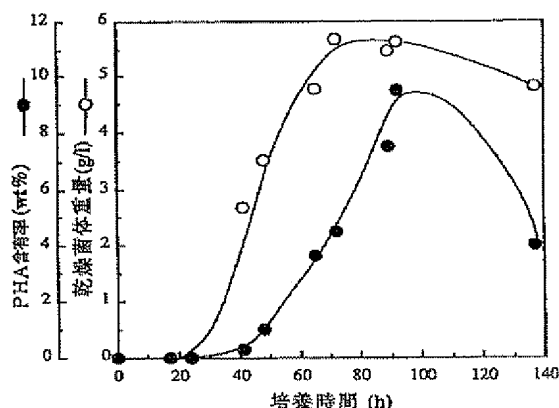
## 【図面の簡単な説明】

【図1】【実施例2】において得られた共重合ポリエステルに関し、培養時間と、ポリエステル含有率および培地1リットル当たりの乾燥菌体重量との関係を示すグラフである。

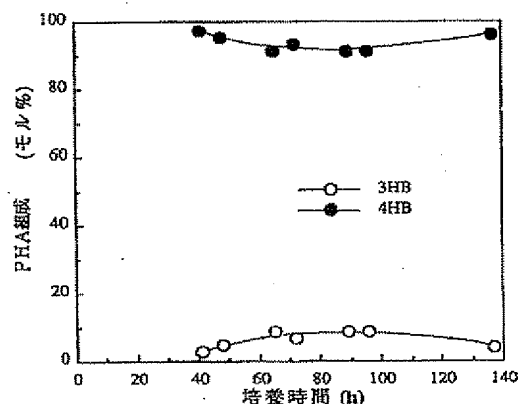
【図2】【実施例2】において得られた共重合ポリエステルに関し、培養時間と、共重合ポリエステル中の前記各単位の存在率との関係を示すグラフである。

【図3】【実施例2】において得られた、培養時間が98時間の共重合ポリエステルの500MHzでの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルである。

【図1】



【図2】



【図3】

